新規標準物質の設定概要

標準物質名：グリコアルブミン測定用常用参照標準物質：JCCRM 611
ロット名：JCCRM 611-1 M, H, HH（3 レベル）

2014/2/13 版

１．はじめに

血清アルブミンの糖化物の割合を示すグリコアルブミン（GA）は、約 2 週間の平均血糖値を反映する新しい糖尿病検査指標として日常検査に導入されている。しかしこれまでは、GA 測定の最上位の基準測定法が確立できておらず、測定値のトレーサビリティ体系が組めないという問題があった。そのため日本臨床化学会（JSCC）糖尿病関連専門委員会ではグリコアルブミン測定の標準法確立プロジェクトを立ち上げ、その中で日常検査法のアンカーとなる基準測定法の検討が進められた。その成果として、新たに開発された同位体希釈質量分析法（ID/MS 法）を用いるグリコアルブミン測定の JSCC 勧告法が 2008 年に発行された。

同専門委員会では、この JSCC 勧告法での標準化を推進するための血清ベースの最上位実試料標準物質の規格を定め、その候補品製造の公募を行った。（社）検査医学標準物質機構からの応募があり、候補品の製造が委託されて、ここに本グリコアルブミン測定用常用参照標準物質（JCCRM 611）が世界に先駆けて新たに設定されるに至った。

２． 標準物質の候補品製造の公募

日本臨床化学会（代表理事：安東由喜雄）の糖尿病関連指標専門委員会（委員長：武井泉）は平成 24 年 10 月 29 日にグリコアルブミン常用参照標準物質の候補品製造の公募を行った。本標準物質は国際的な標準化に用いることから、公募するための資格としては、新規に定めた性能規格を満たす標準物質の製造と値決めができる能力を有し、かつ JSCC 勧告法による測定および確定が可能な施設とした。

３．公募結果

候補品製造の公募に対して（社）検査医学標準物質機構（代表理事：梅本雅夫）から応募があり、公募の資格を満たしていると認められることから、候補品製造から測定および認証までを同機構が実施することになった。

４．認証値設定までの手順

製造した候補品の認証値の設定までを以下の手順で進めた。

（１）性能規格適合性を判定するための性状測定試験
（２）認証値を設定するための JSCC 勧告法による GA 測定試験
（３）データ集計と解析
（４）認証書原案の作成
（５）認証委員会の開催
（６）認証書、ラベルの作成
（７）頒布開始

５．認証委員会

（１）技術委員会

梅本雅夫（委員長：検査医学標準物質機構）、桑克彦（認証委員会顧問：産業技術総合研究所）、星野忠夫（認証委員会顧問：病態解析研究所）、宮下徹夫（認証委員会顧問：日本大学板橋病院）、谷渉（検査医学標準物質機構）、志水衣理（検査医学標準物質機構）、松本英之(旭化成ファーマ)

オブザーバー（認証委員の直接関係者：安川恵子(旭化成ファーマ)

以上から構成され、提出されたデータをもとに詳細な検討を行った。（次ページ記載）

（２）判定委員会

桑克彦（認産業技術総合研究所）、星野忠夫（病態解析研究所）、梅本雅夫（検査医学標準物質機構）の３委員は本標準物質が認証標準物質としての品質を有しているかどうかについて検討を行った。

意見：　本グリコアルブミン標準物質は ID/MS による GA(mmol/mol)の値が認証値となっているが、ユーザーは参考値として記載されるルシカ GA-L による GA(%)を使用する。

すなわち本標準物質における GA(%)と GA(mmol/mol)との関係式「ID/MS 測定値(mmol/mol)＝18.10×ルシカ GA-L 測定値(%)」が妥当なのかが重要と言える。GA(%)は実測値をボロン酸カラムを用いるアフィニティ HPLC による値へ変換しており、2006 年の弘前 Study 当時のルシカ GA-L による測定値もアフィニティ HPLC による値にトレーサブルであったと考えられる。

弘前 Study を実施した当時、44 検体について GA(%)と GA(mmol/mol)を求めて両者の関係式を算出しており、ルシカ GA-L と ID/MS の両測定値が弘前 Study の 2006 年とから変化なければ、今回求める関係式と 2006 年の関係式とは一致するはずである。

それらが一致しない場合は、本グリコアルブミン標準物質候補品を認証することに賛同はできない。

判定：　上述意見に従い、両式の比較を行った。

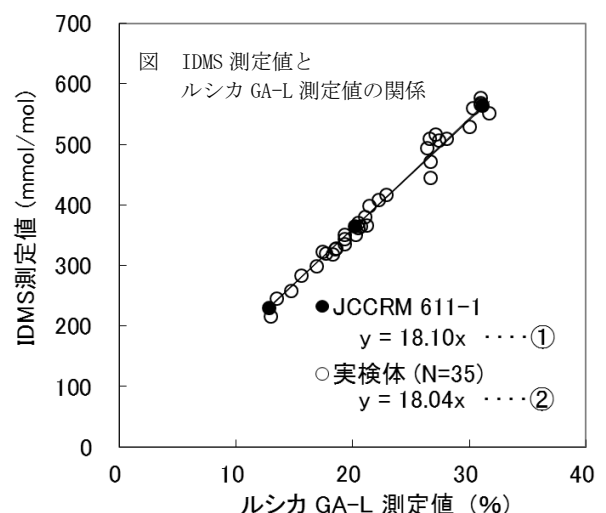
本標準物質の ID/MS 値（mmol/mol）と旭化成ファーマ　ルシカ GA-L による測定値(%)との関係は、旭化成ファーマから提出された値をもとに算出すると、以下の式となった。

ID/MS 測定値(mmol/mol)＝18.10×ルシカ GA-L 測定値(%)　　①

また、「平成 19 年度 臨床検査用標準物質の研究開発」（新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の委託事業とし、産業技術総合研究所で実施）、通称弘前 Study、において行った、実検体（検体数 = 44, 1 回測定, 160～840 mmol/mol）のうち、ID/MS 測定値が本標準物質の ID/MS 測定値の範囲内である検体（検体数 = 35, 1 回測定, 210～580 mmol/mol）について、同様に関係式を求めた。

ID/MS 測定値(mmol/mol)＝18.04×ルシカ GA-L 測定値(%)　　②

このように、今回の関係式①と 2006 年の関係式②は一致した。（右図）

従って、３委員とも、本グリコアルブミン標準物質候補品の認証について異議を認め得ない。

（３）検討内容

性状確認試験から認証書の原案までをまとめて、認証委員会（2013 年６月３日開催)に提出した。そこでの検討結果は以下の通りである。

１）性状測定試験結果

多数（20～25 本）の原料血清を混合して GA 値の異なる 3 レベルの候補品（JCCRM 611-1 M, H, HH）を製造した。それらの性状を測定した結果、日本臨床化学会 糖尿病関連指標専門委員会が定めた性能規格の全ての項目において規格内であることから、標準物質として適合と判定された（表 1)。

２）JSCC 勧告法による GA 測定結果および認証値の計算結果

認証値を設定するための JSCC 勧告法による GA 測定は、標準液および試薬の調製を含めて ReCCS で行った。JSCC 勧告法は、血清から HPLC 分取したアルブミン画分を塩酸加水分解し、遊離したリジンと糖化リジンを ID/MS 法で同時に測定する方法である。測定は各レベルの候補品について、前処理を 6 バイアル（HH レベルは 4 バイアル）行い、それらをそれぞれ 8 回ずつ MS 測定に供した。

それらの結果を集計して、GA 認証値の不確かさのバジェット表を作成し、認証値と拡張不確かさを求めた（表２、表 3)。認証値の不確かさは、ISO の指針 (GUM : 計測における不確かさの表現のガイド [3]) に従い、不確かさの成分を全て合成した標準不確かさに包含係数を掛けて、拡張不確かさとして求めた。不確かさの成分には、測定の不確かさ (測定の再現性の不確かさ、リジンおよび糖化リジン高純度品の純度の不確かさ、秤量の不確かさを含む)、標準物質の均質性および保存安定性の不確かさの各成分が含まれている。

３）認証書の原案の修正など

- 取扱説明書と認証書が分かれているが、認証書の中に取扱説明を書く形式にする。
- 使用方法で 40 回以上の転倒混和としているが、20 回以上に変更する。
- 冷蔵保存でその日のうちに、という表記を８時間以内に変更する。
- 原料がヒト血清由来であることを明記する。また、海外での使用に備えて MSDS を作成する。
- 保管温度を－70℃以下とだけ記載すると液体窒素保存も可となる。念のため、ディープフリーザー中で保管と明記する。
- 表中の認証値と不確かさは別枠に分けて表示すること。
- 標準物質の性状を記載した表に、「日本臨床化学会の公募書類に記載の規格の範囲であることを日常法測定で確認した。」と説明文をつける。アルブミン濃度は改良 BCP 法の測定値を表示すること。
- 認証書には、旭化成ファーマが日常法（酵素法ルシカ GA-L ® ）で測定した値を参考値として記載することにする。
- 認証に関して本委員会で確認した旨を認証書に記載する。

以上の事柄を修正、追加した認証書を作成した。

【コミュータビリティ】

本標準物質と実検体 44 検体の ID/MS 法と日常法の測定値をプロットし、コミュータビリティを評価した。

- ID/MS 値と日常法測定値との直線相関関係が良好で、かつ原点を通ることから、双方の値は妥当であると考えている（直線性 R = 0.99998、切片= 0 として）。

  （注釈：決定係数 $R^2 = 0.99997$ は、そのまま直線性の評価に用いないのが一般的です）

- 2006 年に実検体、44 検体を ID/MS とルシカ酵素法とで測定しており、その結果と今回の標準物質の測定結果を図で比較すると、2006 年の酵素法の測定値が 2013 年より僅かに高い傾向がある。しかし PassingBablok 法による解析の結果では、標準物質の各レベルの±3%（相対値）の範囲でそれらの差は有意ではなく、2006 年の実検体と今回の標準物質の測定結果は一致していると言える（95%信頼水準)。
- 2006 年の 44 検体のデータだけでなく、それ以前にも実検体の測定実験を行っているので、まずは 2006 年以外のデータを見直すこととした。

  後日上記のデータを確認したところ、2005 年に実検体 17 検体で同様に比較実験した測定値の PassingBablok 法による解析の結果も、標準物質の各レベルの±3%（相対値）の範囲で、2006 年と同程度に一致していた。

- ルシカ測定値の安定性(再現性)は、校正によるばらつきと測定のばらつきを併せて±３％程度と考えられる。

これらの考察から、日常法（酵素法ルシカ GA-L R ）おいて、本標準物質と実検体は反応性のコミュータビリティがあるといえる。

６．供給

以上の経緯を経て、グリコアルブミン測定用常用参照標準物質（JCCRM 611-1）が 2013 年 6 月 3 日より検査医学標準物質機構から供給開始となった。

認証責任者、認証日

認証日付	2013 年 6 月 3 日
認証責任者	検査医学標準物質機構　梅本　雅夫

７.追加、修正履歴

（１） 前ページ①②の関係式を認証書に記載していたが、後日、式の記述に誤りがあったこと、式として決定するにはルシカ GA-L のデータが少なすぎることなどから、削除を行った（2013 年 12 月 10 日，梅本 雅夫)。削除した新しい認証書については、MRG 2－131(R2)の符号を付し、ユーザーに通知済み。

（２） ルシカ GA-L の測定数をさらに増やすことにした。（2014 年 2 月）

表１　標準物質候補品（JCCRM 611-1）の性状測定試験結果

表中の性能規格は、日本臨床化学会 糖尿病関連指標専門委員会が定めた「グリコアルブミン測定用標準物質候補品」における規格であり、全項目において、JCCRM 611-1 は規格を満たしている。

項　目	JCCRM 611-1			性能規格	単 位	測 定 方 法
	M	H	HH			
GA	12.8	20.2	31.1	注 1)	%	日常法（酵素法）
材　料	ヒト血清　（N = 20 ～ 25）			N ≧ 20		
密　度	規格内			1.02 ～ 1.03	g/cm^3 (25 ℃)	
粘性率	1.6	1.6	1.6	1.4 ～ 1.7	mPa・s (20 ℃)	毛細管法
総タンパク	7.0	7.1	6.8	6.5 ～ 8.0	g/dL	ビュレット法
アルブミン	4.3	4.1	3.9	3.5 ～ 5.0	g/dL	改良 BCP 法
濁　度	0.2	0.2	0.2	0.5 以下	Abs (710 nm)	吸光光度法
形　態	凍　結			凍　結		
保存安定性	－７０℃以下で１年			１年(－７０℃)		日常法（酵素法）

注１）GA の規格は、日常法で 12～35 %において適切な 3 濃度

表２　標準物質候補品（JCCRM 611-1）の GA 認証値の不確かさバジェット表

記号	要　因	標準不確かさ（相対値 %）		
		JCCRM 611-1 M	JCCRM 611-1 H	JCCRM 611-1 HH
A	測定の繰返し及び再現性 1)	0.62	0.34	0.80
B	リジン標準液 2)	0.12	0.12	0.12
C	DOF-リジン標準液 3)	1.22	1.22	1.22
D	秤量採取　（試料、標準液、安定同位体） 4)	0.18	0.18	0.18
E	保存安定性 5)	0.29	0.29	0.29
F	均質性 5)	0.29	0.29	0.29
Uc	合成標準不確かさ 6)	1.44	1.35	1.53

1) アルブミンの分離濃縮、安定同位体のスパイク、塩酸分解、濃縮乾固の前処理を M, H のバイアルは 6 本、HH については 4 本をそれぞれ行い、それらの同位体強度比を各 8 回ずつ LC/MS 測定した結果を分散分析して求めた。
2) 用いたリジン一塩酸塩の認証標準物質（NMIJ CRM 6018-a、純度 99.8±0.2 %）と標準液調製の各標準不確かさから求めた。
3) DOF-リジン高純度品（ReCCS 精製品、純度 99 %）から調製した DOF-リジン標準液の濃度の標準不確かさは、α-ベンジルオキシカルボニル-DOF-リジン（純度 98±2 %：HPLC 法, カールフィッシャー法）を基準に標定して求めた。
4) 秤量には JCSS（計量法校正事業者認定制度）認定事業者が校正した天秤を使用した。
5) 本標準物質の保存安定性（－70℃凍結）及びバイアル（各 0.5 mL／本）間の均質性を日常法（酵素法）で測定して、いずれも有意な変動はみられなかった。
6) 本標準物質の認証値の合成標準不確かさ（*Uc*）は、表中の各要因の標準不確かを合成する以下の式で求めた。

$$Uc = \sqrt{A^2 + B^2 + C^2 + D^2 + E^2 + F^2}$$

表３　標準物質候補品（JCCRM 611-1）の GA 認証値及び拡張不確かさ 注)

単位：mmol/mol

	JCCRM 611-1 M	JCCRM 611-1 H	JCCRM 611-1 HH
認証値	230	365	564
拡張不確かさ	7	10	18

注）拡張不確かさは（*U*）は、表 2 の合成標準不確かさを mmol/mol に換算した値（*Uc*）と 95%信頼水準における包含係数（$k = 2$）より、$U = Uc \times k$ の式で求めた。